

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

WILLOW DE MOURA CANDEIAS

**AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE UM PEPTÍDEO
SINTÉTICO DERIVADO DE VENENO DE ESCORPIÃO CONTRA O VÍRUS
RESPIRATÓRIO SINCICIAL (VRS), CEPA A2**

PATOS DE MINAS - MG
DEZEMBRO DE 2018

**AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE UM PEPTÍDEO
SINTÉTICO DERIVADO DE VENENO DE ESCORPIÃO CONTRA O VÍRUS
RESPIRATÓRIO SINCICIAL (VRS), CEPA A2**

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

**Orientador: Prof. Dr. Guilherme R. O. e
Freitas**

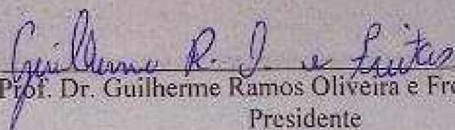
**PATOS DE MINAS – MG
DEZEMBRO DE 2018**

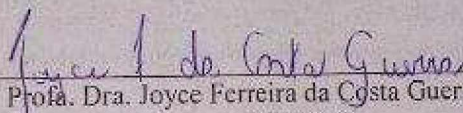
WILLOW DE MOURA CANDEIAS

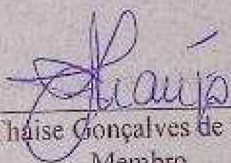
Avaliação *in vitro* da atividade antiviral de um peptídeo sintético derivado de veneno de escorpião contra o vírus respiratório sincicial (VRS), cepa A2

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Banca examinadora:


Prof. Dr. Guilherme Ramos Oliveira e Freitas – IBTEC
Presidente


Profa. Dra. Joyce Ferreira da Costa Guerra – IBTEC
Membro


Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo – IBTEC
Membro

Patos de Minas – MG, 04 de dezembro de 2018.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe, minha avó e à Letícia (in memoriam). As mulheres que mudaram minha vida.

“O caminho da cura pode ser a doença. ”

Edi Rock

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor **Guilherme**, por toda paciência, apoio e disposição comigo. Por ser quase um pai com seus orientandos, por ter me mostrado que a virologia é linda e que ciência de qualidade se faz com muito trabalho e dedicação. Muito obrigado!

À minha **mãe** e à minha **vozinha** querida, pelo amor e carinho que nunca deixaram de existir, mesmo com mais de 1600 Km de distância. Vocês são as pessoas mais importantes da minha vida por me fazerem entender o significado de **família**.

Às minhas **irmãs**, meus **tios**, **primos** e meus **amigos capixabas** por todos os momentos de companheirismo e descontração que me fazem morrer de saudades de casa (e da praia).

À **Laila**, por ser a melhor filha de quatro patas que eu poderia ter!

À **Letícia**, que me fez sentir o que é amor de verdade e que representa pra mim um mundo de boas memórias. O tamanho da minha saudade representa o quanto sou grato por você ter dividido sua vida comigo. Te amo!

À **Gretta**, por ser minha melhor amiga há tanto tempo, pelos encontros anuais e pelas conversas sinceras que eu amo tanto.

Ao **Pedro**, pela amizade sincera de verdade, “cheia de minúcias” e que já dura muiiiitooo tempo. Por todas (muitas) risadas e pelos conselhos que eu não vivo sem. Conte comigo sempre, amigo!

À **Dayanne**, pelas horas intermináveis na biblioteca e no laboratório, por todos os ensinamentos nessa jornada, por acreditar TANTO em mim e principalmente por me fazer seguir em frente mesmo nos meus piores momentos.

À **Isabella**, por ser a melhor parceira de memes dessa vida, pelos passeios pra me alegrar, por me fazer sentir tão bem mesmo com todas as dificuldades da vida e por nunca ter desistido de mim. Obrigado por tudo, Isa!

Aos amigos **Léo, Dani, João Lucas, Mikaelle, Iara e Flávia**, por todos os rolês, rodinhas de conversa e momentos de felicidade que praticamente tornaram vocês minha família patense.

À **Tia Celeste**, por me receber sempre tão bem em sua casa e me fazer ter esperança no mundo.

Aos amigos da **Inovatos e LiNABiotec**, por me mostrarem que a Universidade vai muito além da sala de aula.

Aos **professores** incríveis da UFU – Patos de Minas que não desistem da ciência brasileira apesar dos muitos problemas. Muito obrigado!

Ao **Elcana, Dani, Felipe** e demais **amigos da Viro/Micro** por toda a ajuda nos loucos, mas prazerosos momentos de laboratório que dividimos.

Aos membros do **LACCA** e **técnicos da UFU** por todo auxílio nessa difícil tarefa de cultivar células e vírus.

RESUMO

O vírus respiratório sincicial (VRS) é o principal causador de infecções respiratórias agudas (IRAs), principalmente em crianças menores de 5 anos, sendo responsável por vários casos de hospitalizações e mortes todos os anos, acarretando grandes perdas econômicas. Até o momento não há vacina aprovada para uso contra o patógeno. Assim, a pesquisa e o desenvolvimento de peptídeos com atividade antiviral (AVPs) derivados de fontes naturais se torna uma opção atrativa contra a doença causada pelo VRS. O veneno de diferentes espécies de escorpiões vem se mostrando como uma interessante fonte para a obtenção de AVPs que podem, depois de identificados, serem pontualmente modificados para melhora da atividade farmacológica e diminuição dos efeitos adversos. Nesse sentido, o presente estudo determinou a titulação do VRS, cepa A2, em linhagem de células tumorais derivadas de carcinoma de laringe humana (HEp-2); e avaliou a atividade antiviral de um peptídeo sintético derivado do veneno de escorpião contra o vírus. Para a titulação viral, foram preparadas diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-5}) do estoque viral e determinado o número de unidades formadoras de placa (UFP) por mL presente na amostra. Posteriormente, utilizando o ensaio de MTT, foi investigada a atividade antiviral do peptídeo em diferentes concentrações (400 $\mu\text{g/mL}$ a 3,125 $\mu\text{g/mL}$) antes da infecção viral (ensaio pré-tratamento) ou após a infecção viral (ensaio pós-tratamento). A partir das análises, determinou-se o título do VRS, cepa A2 em $2,7 \times 10^7$ UFP/mL e constatou-se que o peptídeo avaliado apresenta uma tendência à atividade antiviral contra a infecção pelo VRS, com valores variando de 0,23% (6,25 $\mu\text{g/mL}$) a 86,48% (25,0 $\mu\text{g/mL}$) no ensaio pré-tratamento e de 59,51% (50,0 $\mu\text{g/mL}$) a 125,88% (12,5 $\mu\text{g/mL}$) no pós-tratamento. Além disso, pode-se observar que o peptídeo possui maior capacidade em inibir as etapas finais do ciclo viral que as etapas de adsorção e penetração. Portanto, os resultados aqui obtidos tornam-se relevantes, pois demonstram um peptídeo com potencial atividade antiviral, e que futuramente poderá ter sua atividade avaliada contra a infecção pelo VRS em modelos *in vivo*. Ensaio subsequentes serão realizados para a confirmação da atividade antiviral, garantindo maior acurácia nos resultados.

Palavras-chave: AVPs. Viabilidade celular. MTT. Ensaio antiviral pré-tratamento. Ensaio antiviral pós-tratamento.

ABSTRACT

Respiratory syncytial virus (RSV) is the main cause of acute respiratory infections (ARIs), especially in children under 5 years of age, responsible for several cases of hospitalizations and deaths each year, leading to severe economic losses. So far there is no vaccine approved for use against the pathogen. Thus, the research and development of peptides with antiviral activity (AVPs) derived from natural sources becomes an attractive option against the disease caused by RSV. The venom of different species of scorpions has been shown to be an interesting source for obtaining AVPs that can, after being identified, be punctually modified to improve pharmacological activity and decrease in adverse effects. Thereby, the present study determined the titration of RSV, strain A2, in human laryngeal carcinoma-derived tumor cell line (HEp-2); and evaluated the antiviral activity of a synthetic peptide derived from scorpion venom against the virus. For viral titration, serial dilutions (10^{-1} to 10^{-5}) of the viral stock were prepared and the number of plaque forming units (PFU) per ml present in the sample. Subsequently, using the MTT assay, the antiviral activity of the peptide in different concentrations (400 μg / mL to 3.125 μg / mL) was investigated prior to viral infection (pre-treatment assay) or after viral infection (post-treatment assay). From the analyzes, the RSV A2 strain titre, was determined in 2.7×10^7 PFU / mL and it was found that the evaluated peptide shows a tendency to antiviral activity against RSV infection, with values ranging from 0.23% (6.25 μg / mL) to 86.48% (25.0 μg / mL) in the pre-treatment assay and from 59.51% (50.0 μg / mL) to 125 , 88% (12.5 μg / mL) at post-treatment. In addition, it can be observed that the peptide has a greater ability to inhibit the final stages of the viral cycle than the adsorption and penetration steps. Therefore, the results obtained here are relevant because they demonstrate a peptide with potential antiviral activity, and that in the future it may have its activity evaluated against RSV infection in in vivo models. Subsequent assays will be performed to confirm the antiviral activity, ensuring greater accuracy in the results.

Key words: AVPs; Cell viability. MTT. Pre-treatment viral assay. Post-treatment viral assay.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg: micrograma
µL: microlitro
µm: micrometro
A549: linhagem de células tumorais de carcinoma de pulmão humano
AIDS: síndrome da imunodeficiência adquirida
AMPs: peptídeos antimicrobianos
AVPs: peptídeos com atividade antiviral
cm²: centímetro(s) quadrado
CO₂: gás carbônico/dióxido de carbono
Da: Dalton
DMEM: Meio *Dulbecco's Modified Eagles*
DMSO: dimetilsulfóxido
ECP: efeito citopático
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
HEp-2: células tumorais derivadas de carcinoma de laringe humana
HSV-1: vírus herpes simples tipo 1
HCV: vírus da hepatite C
IBTEC: Instituto de Biotecnologia
IRAs: infecções respiratórias agudas
LACCA: Laboratório de Cultura de Células Animas
MTT: brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
mL: mililitro(s)
mRNA: ácido ribonucleico mensageiro
Nº: número
O₂: gás oxigênio
PBS: tampão fosfato-salino
pH: potencial hidrogeniônico
RNA: ácido ribonucleico
RpRd: RNA polimerase dependente de RNA
SARS-CoV: coronavírus causador da síndrome respiratória aguda grave
SFB: soro fetal bovino
UFP: unidade formadora de placa
VERO: linhagem de células derivada de rim de macaco verde africano
VRS: vírus respiratório sincicial
°C: graus Celsius
%: por cento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
2.1 Vírus respiratório sincicial (VRS)	12
2.2 Peptídeos com atividade antiviral (AVPs)	15
3 OBJETIVOS.....	17
3.1 Objetivo geral.....	17
3.2 Objetivos específicos	17
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1 Linhagem celular	18
4.2 Cultivo viral	18
4.3 Titulação viral	19
4.4 Avaliação da atividade antiviral.....	20
4.4.1 Tratamento de células HEp-2 com o peptídeo e posterior infecção viral - ensaio pré-tratamento.....	20
4.4.2 Infecção viral de células HEp-2 e posterior tratamento com o peptídeo - ensaio pós-tratamento.....	21
4.5 Análise dos resultados.....	21
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
6 CONCLUSÕES	28
REFERÊNCIAS	29

1 INTRODUÇÃO

O vírus respiratório sincicial (VRS) é o patógeno mais identificado em crianças acometidas por infecções respiratórias agudas (IRAs), sendo responsável por surtos anuais de bronquite, bronquiolite e pneumonia. Assim, são relevantes as taxas de morbidade e mortalidade ocasionadas pelo VRS, o que o torna um problema de saúde pública com grandes consequências econômicas.

Alguns estudos que buscam vacinas preventivas ou tratamentos eficientes contra o VRS estão em andamento. Entretanto, até o momento, o palivizumabe, um anticorpo monoclonal humanizado, é a única opção para prevenir as infecções por este vírus. Mas a sua aplicação ocorre apenas em casos em que há risco de gravidade para o paciente, devido ao seu alto custo e aos efeitos adversos provocados. Somado a este fato, todas as candidatas à vacina testadas falharam na indução de uma resposta imune apropriada e, por isso não existe nenhuma forma ativa eficaz de prevenir as infecções provocadas pelo VRS.

Por estas razões, fica clara a necessidade de buscar novas drogas capazes de prevenir ou combater as infecções pelo VRS. Os peptídeos com atividade antiviral (AVPs), são uma alternativa ao combate dessas infecções, uma vez que são capazes de agir em diferentes etapas do ciclo de replicação viral e, já foi demonstrada sua eficácia contra diferentes espécies virais. Essas moléculas têm diversas características que favorecem sua aplicação como fármacos bioativos e podem ser obtidas a partir de produtos naturais ou quimicamente sintetizados.

Dentre as várias fontes disponíveis de AVPs, tem-se como uma interessante opção o veneno dos escorpiões, uma vez que esses animais são encontrados em diferentes partes do mundo, inclusive no território brasileiro. Estudos prévios identificaram peptídeos no veneno de escorpiões das espécies *Lychas mucronatus* e *Euscorpiops validus* que, após passarem por modificações estruturais, apresentaram significativa atividade antiviral (ZENG et al., 2018; LI et al., 2011).

Somada a estes fatos, a biotecnologia se configura como uma importante ferramenta no auxílio à saúde, pois permite a avaliação *in vitro* de AVPs, bem como a sua posterior modificação para o aperfeiçoamento de sua atividade biológica, garantindo sua maior eficácia e segurança, tornando-os excelentes candidatos para uso terapêutico. Além disso, a possibilidade de produção em larga escala e geração de patente aumenta ainda mais o interesse pelos AVPs. Sendo assim, a atividade antiviral desses compostos merece ser testada e o presente

trabalho teve como objetivo principal a avaliação in vitro da atividade antiviral de um peptídeo sintético derivado do veneno de escorpião contra o VRS.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Vírus respiratório sincicial (VRS)

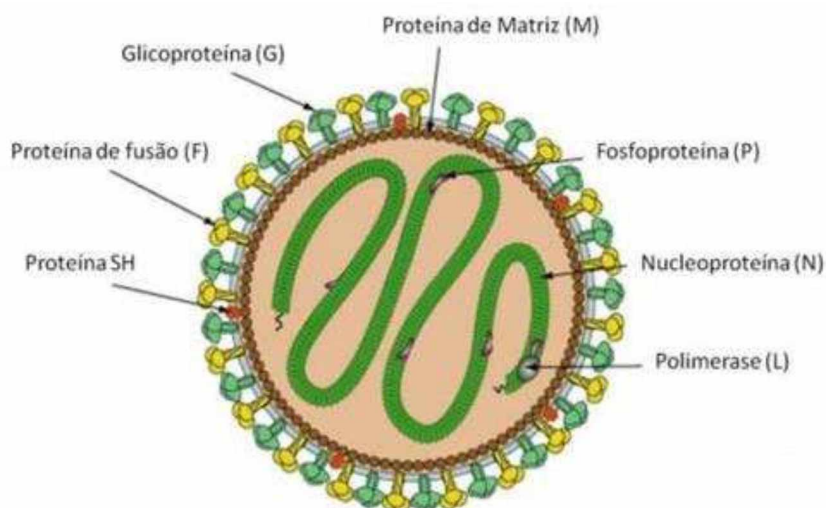
O VRS é o patógeno que mais causa infecções respiratórias agudas (IRAs) em crianças, tendo sido identificado em 33,1 milhões de casos de hospitalização em todo o mundo, que resultaram em cerca de 60 mil mortes apenas no ano de 2015 (SHI et al., 2017). Esse vírus também pode acometer com maior gravidade, idosos e pessoas imunocomprometidas, uma vez que as reinfecções durante a vida adulta são comuns (HABER, 2018). Devido ao grande número de eventos infecciosos, o impacto socioeconômico causado pelo VRS é bastante significativo, tornando-o um problema de saúde pública mundial (HEIKKINEN; OJALA; WARIS, 2017). Estima-se que, apenas nos Estados Unidos da América, o custo pela hospitalização de cada criança com menos de 5 anos de idade infectada pelo VRS seja de aproximadamente 4,5 mil dólares (DÍEZ-DOMINGO et al., 2014).

O VRS foi isolado pela primeira vez em 1955, a partir de chimpanzés do Walter Reed Army Institute of Research, em Washington (MORRIS; BLOUNT; SAVAGE, 1956). Os animais infectados apresentavam sintomas típicos de uma doença respiratória, como tosse, coriza e espirros frequentes. Posteriormente, em 1957, o vírus foi isolado e caracterizado em crianças que apresentavam sintomas relacionados à pneumonia. Devido a sua afinidade pelo trato respiratório e sua característica marcante de formar sincícios nas células onde era cultivado, o agente foi denominado “vírus respiratório sincicial” (CHANOCK; ROIZMAN; MYERS, 1957; CHANOCK; FINBERG, 1957). Sua identificação no Brasil ocorreu somente em 1964, quando Candeias e colaboradores (1967) investigaram amostras coletadas de crianças que apresentavam quadros de pneumonia e bronquiolite.

O VRS (**Figura 1**) está classificado na ordem Mononegavirales, onde estão compreendidos outros patógenos importantes, como o vírus da raiva (família Rhabdoviridae) e o vírus ebola (família Filoviridae). Sua taxonomia foi revisada recentemente, estando incluso

desde 2015 na família Pneumoviridae e no gênero Orthopneumovirus, juntamente com o VRS bovino (International Committee in Taxonomy Viruses – ICTV, 2018).

Figura 1: Modelo representativo da partícula do vírus respiratório sincicial (VRS).



Fonte: Adaptado de Swiss Institute of Bioinformatics (SIB), 2011.

Em semelhança a outros vírus respiratórios, o VRS é envelopado e possui como genoma um RNA de fita simples, não segmentado, com polaridade negativa e composto por cerca de 15 mil nucleotídeos (PANGESTI et al., 2018). A tradução do mRNA dá origem a 11 proteínas: não estrutural 1 (NS1), não estrutural 2 (NS2), nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína de matriz (M), pequena proteína hidrofóbica (SH), glicoproteína de adesão (G), proteína de fusão (F), fator regulatório de RNA (M2-1), fator de transcrição M2-2 (M2-2) e subunidade de polimerase (L) (COLLINS; FEARNES; GRAHAM, 2013). As funções destas proteínas estão descritas de forma sucinta na **Tabela 1**.

O vírus possui dois grupos antigênicos (A e B), identificados com base na sequência da proteína G (MUFSON et al., 1985), e vários subtipos e genótipos classificados a partir de seu genoma. Durante as epidemias, os dois grupos podem circular ao mesmo tempo, com o predomínio de um deles (VANDINI; BIAGI; LANARI, 2017). Enquanto alguns estudos sugerem que diferentes subtipos e genótipos virais podem causar infecções mais ou menos graves (LAHAM et al., 2017; YOSHIHARA et al., 2016; ESPOSITO et al., 2015; MARTINELLO et al., 2002), outros indicam que não há diferença significativa nessa gravidade (OTIENO et al., 2017; CUI et al., 2015; FODHA et al., 2007).

Tabela 1: Funções das proteínas expressas pelo vírus respiratório sincicial (VRS).

Proteína	Função
Não estrutural 1 (NS1)	Indução e sinalização de interferons (IFNs)
Não estrutural 2 (NS2)	Inibição de apoptose
Nucleoproteína (N)	Regulação da transcrição e da replicação do RNA viral
Fosfoproteína (P)	Fator de tradução e replicação
Proteína de matriz (M)	Responsável pela morfogênese viral
Pequena proteína hidrofóbica (SH)	Função desconhecida
Glicoproteína de adesão (G)	Promove a adesão do vírus à célula
Proteína de fusão (F)	Promove a fusão do vírus à célula
Fator regulatório de RNA (M2-1)	Fundamental para o processo de transcrição
Fator de transcrição M2-2 (M2-2)	Controle do balanço entre transcrição e replicação
Subunidade da polimerase (L)	Atividades enzimáticas de RNA polimerase dependente de RNA (RpRd), poliadenilação e formação de estrutura de cap do mRNA viral

Fonte: Adaptado de MACHADO, 2012.

As epidemias virais ocorrem anualmente em diferentes partes do mundo, porém seguem padrão sazonal específico, variando de acordo com a localidade (OBANDO-PACHECO et al., 2018). Estudos reportam que em regiões de clima temperado, os picos de infecção pelo VRS são observados no inverno (BROBERG et al., 2018; JEPSEN et al., 2018; TAYLOR et al., 2016), enquanto que as pesquisas analisando regiões de clima tropical apontam uma maior prevalência de infecções durante as estações chuvosas do ano (DE-PARIS et al., 2014; MOURA et al., 2013; BLOOM-FESHBACH et al., 2013; PAIVA et al., 2012).

A transmissão viral pode ocorrer de forma direta ou indireta, por contato com secreções, ou via aerossóis devido à tosse e espirros do indivíduo infectado, além de mãos e objetos contaminados. Ainda, o VRS pode manter sua capacidade infecciosa por várias horas em diferentes superfícies, tendo sua propagação favorecida em ambientes fechados (PAYNTER, 2015; PICA; BOUVIER, 2014). As manifestações clínicas da infecção pelo VRS são semelhantes às de outros patógenos virais respiratórios e incluem tosse, congestão nasal, dor de garganta e dispneia (BRANCHE; FALSEY, 2015). Em casos mais graves pode-se observar o desenvolvimento de bronquite, bronquiolite, pneumonia e complicações graves como falha respiratória, acarretando na morte do paciente (STEIN et al., 2017).

Para a realização de testes iniciais, o cultivo do VRS em laboratório pode se dar com a inoculação em células animais, já que o cultivo in vitro é mais econômico e menos burocrático em relação a métodos in vivo ou em ovos embrionários, por exemplo (GONZÁLEZ-PARRA; DOBROVOLNY, 2018; TAYLOR, 2017). Como o VRS apresenta tropismo por células do trato respiratório (CHANOCK; ROIZMAN; MYERS, 1957), linhagens celulares derivadas desse sistema, como a HEp-2 (linhagem de carcinoma de laringe humana), são as mais

adequadas para o estudo do microrganismo (TIWARI et al., 2014; DERSCHEID et al., 2013). Outros tipos de células, como a VERO e A549, também podem ser empregadas para o estudo do vírus. Porém, em alguns trabalhos já foi observado uma diminuição na capacidade infecciosa do VRS quando o mesmo é inoculado nessas linhagens em relação a HEp-2 (CORY et al., 2016; DERSCHEID et al., 2013; KWILAS et al., 2009).

Apesar dos mais de 60 anos de pesquisas com esse agente viral, até o presente momento não existe nenhuma vacina licenciada e aprovada para uso contra o VRS (SIMÕES et al., 2018; VILLAFANA et al., 2017). Atualmente, a única alternativa disponível para a prevenção da infecção é o palivizumabe (SIMÕES et al., 2018; CHECCHIA et al., 2017), um anticorpo monoclonal humanizado que age contra a proteína de fusão do microrganismo, inibindo sua entrada na célula (FELTES et al., 2003; PEDIATRICS, 1998). Porém, sua indicação é restrita a grupos com alto risco de infecção pelo vírus, como recém-nascidos portadores de doença pulmonar crônica ou doença cardíaca congênita (PAVILACK et al., 2018; MURRAY; SAXENA; SHARLAND, 2014). Essa precaução existe porque a administração do palivizumabe envolve um custo relativamente alto e pode causar efeitos adversos, levando ao agravamento do quadro patológico do indivíduo (KUA; LEE, 2017; MANZONI et al., 2017). Por isso, há grande interesse na pesquisa de novos antivirais eficientes contra esse patógeno, tornando-o cada vez mais uma prioridade global de saúde (MENG et al., 2014).

2.2 Peptídeos com atividade antiviral (AVPs)

Os peptídeos são moléculas formadas a partir da ligação de dois ou mais resíduos de aminoácidos. Assim, dois aminoácidos ligados formam um dipeptídeo, três um tripeptídeo, quatro um tetrapeptídeo e assim por diante. Quando há muitos aminoácidos ligados, tem-se um polipeptídeo. Estes ainda são diferentes das proteínas por apresentarem uma massa molecular de até 10.000 daltons (Da) (NELSON; COX, 2014). A formação dessas biomoléculas se dá através de ligações covalentes, denominadas ligações peptídicas, e ocorrem por uma reação de condensação entre os grupos α -carboxílico e α -amino de dois aminoácidos (BARREIROS; BARREIROS, 2018; BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2014).

Em animais, os peptídeos desempenham papéis importantes para garantir o correto funcionamento do organismo, podendo agir como peptídeos hormonais, neuropeptídeos ou fatores de crescimento, por exemplo (COOPER; HAUSMAN, 2013). Isso motiva a execução de vários estudos envolvendo essas moléculas, afim de realizar sua identificação, síntese e otimização, com possibilidades de aplicação em diferentes áreas, incluindo a da saúde. Isso

torna o crescimento do mercado terapêutico de peptídeos bastante promissor, tendo movimentado quase 15 bilhões de dólares somente em 2011 (KASPAR; REICHERT, 2013).

Os AVPs fazem parte do grupo dos peptídeos antimicrobianos (AMPs) e vêm se mostrando como uma alternativa viável para o combate de infecções virais (DA MATA et al., 2017; CHEW; POH; POH, 2017; QURESHI et al., 2014). Essas moléculas podem ser encontradas em praticamente toda forma de vida e funcionam como parte do sistema imune inato do hospedeiro em resposta a diferentes patógenos (WIESNER; VILCINSKAS, 2010; HANCOCK; SAHL, 2006). Os AVPs podem interferir em diferentes etapas dos ciclos virais, como o bloqueio da adsorção, da fusão ou até da replicação (QURESHI et al., 2014; PANG; TAM; ZHENG, 2009). Além disso, apresentam características que os tornam favoráveis para a manipulação e administração, como baixo peso molecular, baixa toxicidade, rápida eliminação do organismo hospedeiro, poucos efeitos adversos e baixo custo de síntese (THAKUR; QURESHI; KUMAR, 2012). Todos esses fatores despertaram grande interesse da indústria farmacêutica nos últimos anos e estimulam o desenvolvimento de novos estudos para identificação e modificação desses peptídeos (FOSGERAU; HOFFMANN, 2015; MÁRQUEZ-ESCOBAR et al., 2015; UHLIG et al., 2014).

O Enfuvirtida ou T20 (Fuzeon) foi o primeiro AVP aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento de pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), que não responderam a outros antivirais (MAKINSON; REYNES, 2009; HE et al., 2008; MATTHEWS et al., 2004). Desde então, novos AVPs obtidos a partir de fontes naturais ou síntese química vêm sendo testados (SKALICKOVA et al., 2015; GWYER; CURRIE; DAVIDSON, 2013; CHANG et al., 2012).

Geralmente, os AVPs são derivados de segmentos de proteínas naturais e seus homólogos, podendo ter sua atividade biológica melhorada com a avaliação e posterior síntese química (CHANG; YANG, 2013; LI et al., 2011). Essas moléculas podem ser encontradas em diferentes fontes, como plantas (MUSIDLAK; NAWROT; GOŹDZICKA-JÓZEFIK, 2017; SHAN et al., 2013; XU et al., 2010), secreções de sapos (RAAYMAKERS et al., 2017; CONLON et al., 2014) e até mesmo a partir de ostras (GREEN; SPECK, 2018; GREEN et al., 2014). Adicionalmente, assim como a fonte dos peptídeos avaliados no presente trabalho, outra possível alternativa para a busca de AVPs são os venenos de animais como os escorpiões (PENNINGTON; CZERWINSKI; NORTON, 2018; DA MATA et al., 2017; WANG; WANG, 2016).

Como exemplo, Li e colaboradores (2011) avaliaram a atividade antiviral do Mucroporin-M1, uma molécula derivada de um peptídeo obtido a partir do veneno do escorpião

Lychas mucronatus, e comprovaram que a mesma foi capaz de impedir a replicação do coronavírus causador da síndrome respiratória aguda (SARS-CoV), vírus do sarampo e influenzavírus. Outra pesquisa demonstrou a eficácia do mesmo peptídeo contra o vírus da hepatite B, evidenciando seu amplo espectro (ZHAO et al., 2012). Em um estudo recente, Zeng e colaboradores (2018) identificaram um peptídeo do veneno de *Euscorpiops validus*, que após modificações pontuais, foi capaz de inativar completamente a atividade do vírus herpes simples tipo 1 (HSV-1).

O número de trabalhos envolvendo os AVPs é tão crescente que pesquisadores listaram peptídeos com atividade antiviral altamente eficientes em uma base de dados online chamada AVPpred (THAKUR; QURESHI; KUMAR, 2012). Acessando a plataforma, o usuário pode comparar sequências específicas com as já depositadas no site, avaliando *in silico* a possível atividade antiviral da molécula estudada (LÓPEZ-MARTÍNEZ et al., 2013). Esses dados reforçam a importância de se investigar o efeito antiviral de peptídeos derivados de fontes naturais, tais como os venenos de escorpiões, já que essas moléculas podem servir como uma interessante alternativa terapêutica contra as infecções causadas pelo VRS.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antiviral *in vitro* de um peptídeo sintético derivado do veneno de escorpião contra o VRS, cepa A2.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar o cultivo e determinar o título do VRS em linhagem de células HEp-2;
- Avaliar a capacidade do peptídeo em conferir resistência às células contra a infecção pelo VRS (ensaio pré-tratamento);
- Avaliar a capacidade do peptídeo em inibir as etapas finais do ciclo de replicação do VRS (ensaio pós-tratamento).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagem celular

Para a realização dos experimentos foi utilizada a linhagem celular HEp-2 (células tumorais derivadas de carcinoma de laringe humana, ATCC® CCL-23). Essas células foram mantidas criopreservadas, com meio de congelamento composto por 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Isofar Ltda.) diluído em soro fetal bovino (SFB, Hyclone™, Gibco®, EUA), em um reservatório de nitrogênio líquido no Laboratório de Cultura de Células Animas (LACCA) do Instituto de Biotecnologia (IBTEC) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Campus Patos de Minas.

Após serem retiradas do reservatório, as células foram descongeladas rapidamente em banho-maria a 37°C, e levadas até a câmara de fluxo laminar previamente descontaminada. Depois, foram transferidas para um tubo falcon de 15 mL, contendo 5 mL de meio *Dulbecco's Modified Eagles* (DMEM GlutaMAX™, Gibco®, EUA), tamponado com bicarbonato de sódio, pH 7,4, com adição de SFB (5%) e os antibióticos penicilina (10.000 µg/mL, Hyclone™, GE Healthcare Life Sciences, EUA) e estreptomicina (10.000 U/mL, Hyclone™). Em seguida, as células foram submetidas à centrifugação a 1000 xg durante 5 minutos. O sobrenadante obtido foi descartado e, ao precipitado de células foram adicionados 5 mL de DMEM suplementado com SFB e antibióticos. Depois, todo o conteúdo do tubo foi transferido para uma garrafa de cultura de células estéril, de 25 cm² de área. As células foram mantidas em estufa com 5% de CO₂ e a 37°C, observadas a nível macroscópico e microscópico diariamente, com troca do meio de cultivo em dias alternados, até que se atingisse a confluência mínima de 80% para o prosseguimento dos experimentos.

4.2 Cultivo viral

Para o cultivo viral foi utilizada a cepa padrão A2 do VRS, subgrupo A (ATCC® VR-1540™), e seu cultivo foi feito em células HEp-2 confluídas em uma garrafa de 75cm² de área. Após 24h do preparo da garrafa, quando as células atingiram aproximadamente 80% de confluência, o meio foi descartado e a monocamada foi lavada duas vezes com tampão fosfato-salino (PBS). Foram então adicionados à monocamada celular 2 mL de uma solução viral

estoque contendo a cepa viral padrão e mais 3 mL de meio DMEM livre de SFB e antibióticos. A garrafa preparada foi levada para a estufa com 5% de CO₂ e a 37°C, incubada por 30 minutos, com agitação suave a cada 10 minutos. Após esse período, foram acrescentados 10 mL de meio DMEM contendo SFB a 5%, e a garrafa foi incubada novamente nas mesmas condições descritas anteriormente.

Diariamente, a monocamada celular foi observada a nível microscópico até a detecção de efeito citopático (ECP) viral característico. Posteriormente, as células foram removidas do fundo da garrafa com o auxílio de um cell scraper, ressuspensas no meio de cultura, e alíquotas de 1 mL de solução de estoque viral foram distribuídas em eppendorfs, e em seguida armazenadas em ultrafreezer a -80°C.

4.3 Titulação viral

A titulação do estoque viral foi realizada pelo método de contagem de placas de lise, pelo qual se calcula o número de unidades formadoras de placas (UFP) presentes em um mL de solução estoque viral (UFP/mL). Primeiramente, foi preparada uma placa de 12 poços com 1×10^6 células/mL. Após 24-48h, quando as células atingiram aproximadamente 80% de confluência, o meio foi descartado e a monocamada foi lavada duas vezes com PBS. Paralelamente, uma diluição seriada decimal variando de 10^{-1} a 10^{-5} foi preparada a partir do estoque viral em meio DMEM livre de SFB e antibióticos. Posteriormente, 500 µL das diluições de 10^{-2} a 10^{-5} foram adicionados à monocamada celular, em duplicata. A placa foi levada para a estufa com 5% de CO₂ e a 37°C, incubada por 30 minutos, com agitação suave a cada 10 minutos. Após o período de incubação, foram acrescentados em cada poço, 500 µL de meio DMEM contendo SFB a 5% e antibióticos e a placa foi incubada nas mesmas condições descritas anteriormente. Como controle positivo, dois poços da placa foram inoculados com a solução do estoque viral, sem diluição prévia e, como controle negativo, foram utilizados dois poços contendo apenas monocamada celular, sem o inóculo viral. Diariamente, a monocamada celular foi observada até a detecção de ECP.

Quatro dias após a infecção, com a detecção do ECP e a formação das placas de lise na monocamada celular, o meio foi descartado e a monocamada foi lavada uma vez com PBS. Em seguida, foram adicionados a cada poço, 200 µL de uma solução de cristal violeta a 0,5 % (g/v), diluído em PBS. Depois de 5 minutos de incubação, a temperatura ambiente, a solução corante foi descartada e o número de placas de lise foi contado na menor diluição que apresentou ECP. Cada placa de lise, teoricamente, é formada por uma única partícula viral. Sendo assim, o

cálculo do título viral foi realizado de acordo com a fórmula descrita a seguir, e o título obtido foi expresso em unidades formadoras de placas/mL (UFP/mL).

$$T = \frac{\text{Nº de placas de lise} \times \text{Fator de diluição}}{V}$$

Onde:

T = título viral, calculado em unidades formadoras de placa de lise por mL (UFP/mL);

Nº de placas de lise = número médio de placas de lise observadas por poço;

Fator de diluição = fator da menor diluição na qual placas de ECP foram observadas;

V = volume do estoque viral inoculado em cada poço da placa, em mL.

4.4 Avaliação da atividade antiviral

4.4.1 Tratamento de células HEp-2 com o peptídeo e posterior infecção viral - ensaio pré-tratamento

Para o ensaio pré-tratamento, células HEp-2 na concentração de $1,0 \times 10^6$ células/mL, suspensas em meio DMEM com 10% de SFB e sem antibiótico, foram semeadas em uma placa de 96 poços e incubadas por 24h em estufa com 5% de CO₂ e a 37°C. Após atingir a confluência, o meio foi cuidadosamente aspirado, e as células foram tratadas com 100 µL do peptídeo, previamente preparado em meio DMEM com 10% de SFB e sem antibiótico, em diluições seriadas de 1:2 (de 400 µg/mL até 3,125 µg/mL), em triplicata. Em seguida, a placa foi novamente incubada em estufa por 4h nas mesmas condições descritas anteriormente. Após esse período, o meio contendo o peptídeo foi aspirado, e 100 µL de meio DMEM com 10% de SFB e sem antibiótico, contendo 10^5 UFP/mL do VRS foram adicionados nos poços onde estavam as células previamente tratadas.

Posteriormente à infecção, a placa permaneceu incubada em estufa por aproximadamente 72h, até o aparecimento de ECP característico, e então realizou-se o ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) para avaliação da viabilidade celular. Para isso, adicionou-se 10 µL de MTT em cada poço da placa, a uma concentração final de 5 µg/mL, e esta foi incubada por 4h. O meio com MTT foi então removido e substituído por 150 µL de DMSO, com posterior agitação suave por 10 minutos, até que se realizasse a leitura em espectrofotômetro a 560 nm. Três poços contendo células infectadas,

porém não tratadas com o peptídeo, foram utilizados como controle viral. Outros três poços contendo células não infectadas e não tratadas foram utilizados como controle da viabilidade celular.

4.4.2 Infecção viral de células HEp-2 e posterior tratamento com o peptídeo - ensaio pós-tratamento

Uma suspensão de células HEp-2 ($1,0 \times 10^6$ células/mL), preparada em meio DMEM com 10% de SFB e sem antibiótico, foi semeada em uma placa de 96 poços e incubadas por 24h em estufa com 5% de CO₂ e a 37°C. Posteriormente, o meio de cultivo celular foi aspirado, e foram adicionados aos poços da placa 10^5 UFP/mL de VRS, preparados em meio DMEM com 10% de SFB e sem antibiótico. Após 1h de incubação em estufa, nas mesmas condições descritas anteriormente, o meio foi novamente aspirado e então adicionou-se 100 µL do peptídeo previamente diluído em meio DMEM com 10% de SFB e sem antibiótico, em diluições seriadas de 1:2 (de 400 µg/mL até 3,125 µg/mL), em triplicata. Posteriormente, a placa permaneceu incubada em estufa por aproximadamente 72h, até o aparecimento de ECP característico, e então foi realizado o ensaio de MTT de acordo com o descrito no item 4.4.1. Três poços contendo células infectadas, porém não tratadas com o peptídeo, foram utilizados como controle viral. Outros três poços contendo células não infectadas e não tratadas foram utilizados como controle da viabilidade celular.

4.5 Análise dos resultados

Para determinar a atividade antiviral (%) do peptídeo, nas diferentes concentrações testadas, e em cada um dos ensaios realizados (pré-tratamento e pós-tratamento), foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Atividade antiviral (\%)} = \left(\frac{\square - \square}{\square - \square} \right) \times 100$$

Onde:

A = densidade ótica média de células infectadas e tratadas com as diferentes concentrações do peptídeo;

B = densidade ótica média do controle viral (células infectadas e não tratadas);

C = densidade ótica média do controle de viabilidade celular (células não infectadas e não tratadas).

Para analisar os resultados obtidos, utilizou-se o software GraphPad Prism (v.6). A correlação entre as variáveis “concentração de peptídeo ($\mu\text{g/mL}$)” e “atividade antiviral (%)” foi determinada para dados não paramétricos (coeficiente de correlação de Spearman – r) com o intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). Através da análise de regressão linear foi determinada a linha de tendência da atividade antiviral e o seu coeficiente de determinação (r^2).

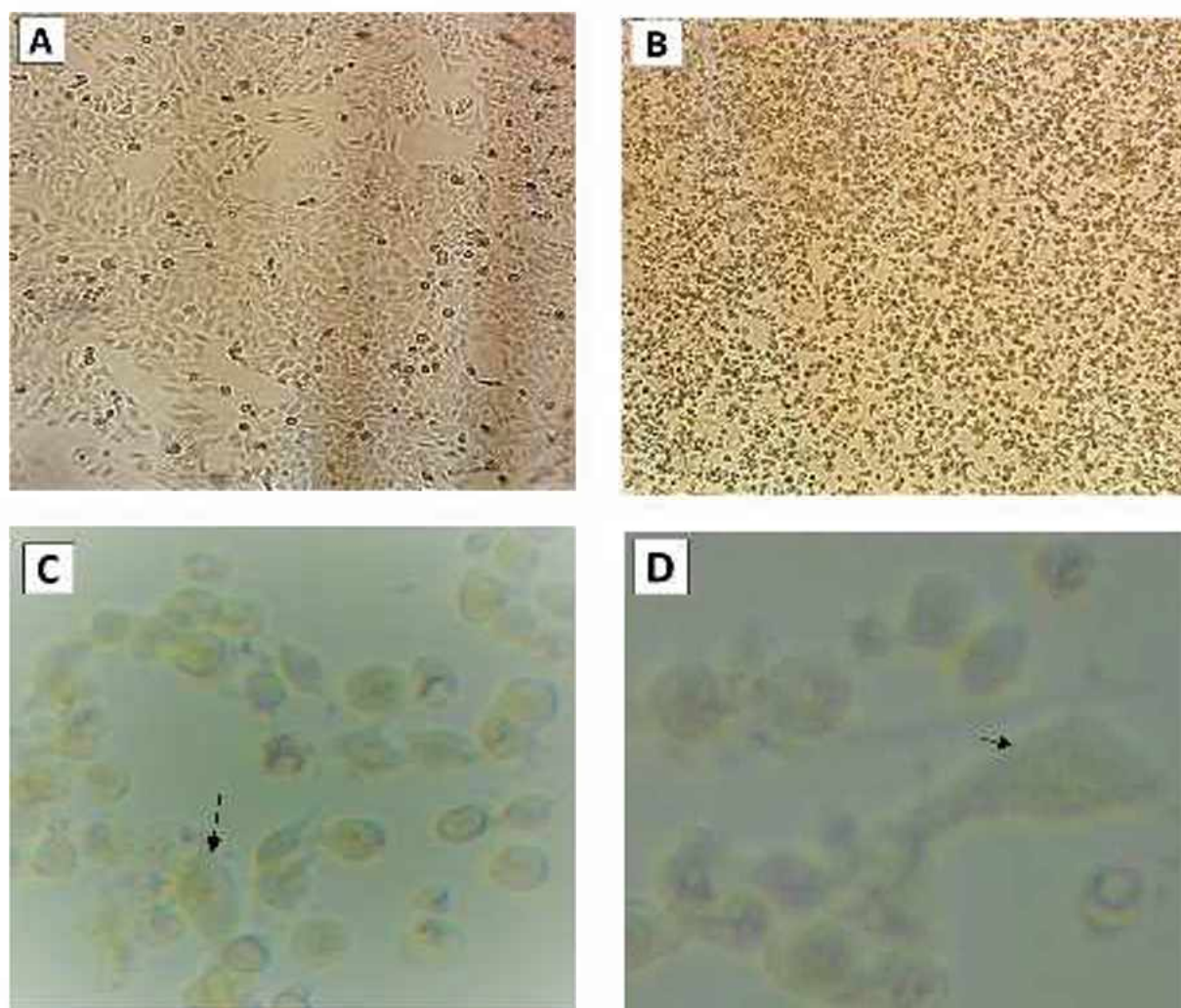
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, foi determinado o título da cepa padrão do VRS, através do método de contagem de unidades formadoras de placas de lise (UFP), para que posteriormente, o estoque viral pudesse ser empregado nos experimentos de avaliação *in vitro* da atividade antiviral. Aproximadamente 72h após a inoculação do VRS em HEp-2, pôde-se observar as primeiras alterações morfológicas nas células infectadas, evidenciada pela presença dos sincícios (**Figura 2**). Os sincícios são resultado da ação da proteína F do VRS, e são os responsáveis pela fusão de uma célula infectada com as adjacentes, originando células maiores e multinucleadas. Essa é considerada uma estratégia que permite que a infecção viral avance de forma mais rápida, além de ser um mecanismo de escape das barreiras do sistema imune do hospedeiro (SHAIKH; CROWE, 2013; HEMINWAY et al., 1994). O aumento progressivo desses sincícios leva à lise celular, possibilitando a observação de regiões sem células que são avaliadas por técnicas específicas, como a de contagem de UFP (GAGLIARDI et al., 2017; GOWER et al., 2005).

Após aproximadamente 96h de infecção viral, a monocamada celular foi corada utilizando o cristal violeta para a observação macroscópica das placas de lise resultantes. Este corante foi internalizado apenas pelas células íntegras, ou seja, aquelas que não foram lisadas pelo vírus, resultando em uma cor roxa intensa. Ao contrário, nos locais onde a infecção viral

provocou a lise celular, o corante não foi fixado, formando pontos incolores denominados placas de lise (Figura 3), e cada ponto incolor nos poços da placa foi contado como uma UTP (BAER; KEHN-HALL, 2014). A partir da contagem das placas de lise na diluição de 10^{-5} , a menor diluição na qual foram observadas essas estruturas, o título final do VRS cepa A2 foi igual a $2,7 \times 10^5$ UTP/mL. Esse valor é semelhante ao encontrado por Souza (2018), que usou a mesma metodologia para a padronização do processo de titulação da cepa A2 do VRS, e obteve um valor de $5,4 \times 10^5$ UTP/mL. Essa constância nos valores encontrados indica a confiabilidade do método empregado e a manutenção da capacidade infecciosa do estoque viral utilizado para a realização dos experimentos.

Figura 2: Alterações morfológicas em células HEp-2 causadas pela infecção por VRS cepa A2 após 72h. (A) Células HEp-2 não infectadas (aumento de 100X); (B) Células HEp-2 infectadas pelo VRS cepa A2 (aumento de 100X). É possível observar o arredondamento celular e a lise de algumas células após o aparecimento do efeito citopático; (C) e (D) Streptococos causados pela infecção por VRS (aumento de 400X).



Fonte: Próprio autor.

Figura 3: Titulação do VRS, cepa A1, pela formação de colônias formadoras de placa por mL (CFP/mL). Células HEp-2, cultivadas a uma concentração de 1×10^6 células/mL, foram infectadas com diluições seriadas decimais (10^2 a 10^7) do VRS, em duplicata, por aproximadamente 96h. (A) Em A1 e A2, as células foram inoculadas com o estoque viral sem diluição prévia (controles virais); em C3 e C4 as células não foram inoculadas com o estoque viral (controles celulares); em B1 e B2, C1 e C2, A3 e A4, e B3 e B4 as células foram inoculadas respectivamente com as diluições 10^2 , 10^4 , 10^6 e 10^7 de estoque viral. (B) Destaque do poço B3 evidenciando as placas de lise causadas pelo VRS (setas). (C) Destaque do poço C3 (controle celular).



Fonte: Própria autor.

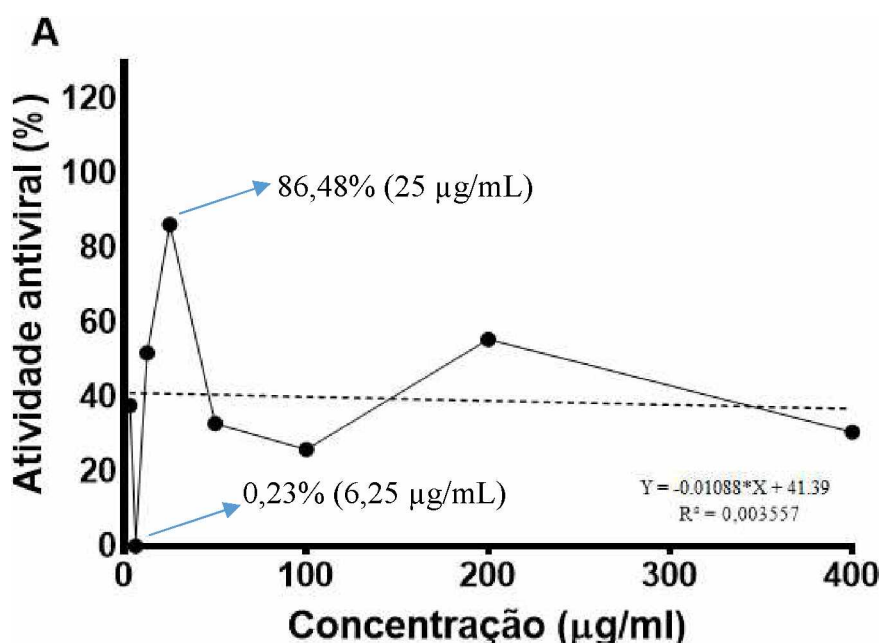
A utilização dessa metodologia para a determinação do título viral de um estoque é possível devido à capacidade do VRS em produzir sincícios em cultura de células (JORDAN, 1962; SHIGETA et al., 1968), resultando no aparecimento gradual das placas de lise (TRIPP; JORQUERA, 2016; MAHY; KANGRO, 1996). A quantidade e o tamanho das placas podem variar de acordo com o inoculo viral empregado e, também com o tempo de contato entre as células e o vírus. Sendo assim, quanto mais partículas virais estiverem presentes, mais placas podem ser formadas, e quanto maior for a duração da interação dos vírus com as células, maiores podem ser essas estruturas. (BAER; KEHN-HALL, 2014; DULBECCO; VOGT, 1953).

Para a avaliação da atividade antiviral do peptídeo analisado, foi realizado o ensaio de MTT conforme proposto por Mosmann (1983), com algumas modificações. O MTT é um sal hidrossolúvel de coloração amarela que é incorporado pelas mitocôndrias de células vivas, sendo posteriormente reduzido a sal de formazana. Este sal é depois armazenado no citoplasma celular, podendo ser solubilizado com a adição de dimetilsulfóxido (DMSO), produzindo uma coloração azul-violeta, cuja intensidade de cor é lida em espectrofotômetro a 560 nm. Assim, a absorbância obtida é diretamente proporcional a viabilidade celular, possibilitando a comparação dos valores obtidos a partir de células infectadas tratadas e não tratadas com o peptídeo e, consequentemente, relativa à atividade antiviral do composto (MULLER, 2011;

MOSMANN, 1983). O ensaio pré-tratamento foi realizado com o objetivo de verificar se o material teste é capaz de conferir resistência à célula contra a infecção viral pelo VRS, impedindo as etapas iniciais do ciclo de replicação viral, nas quais a partícula penetra na célula hospedeira. Já o ensaio pós-tratamento foi empregado para verificar a capacidade do peptídeo em inibir as etapas tardias do ciclo de replicação viral, posteriores à sua entrada na célula hospedeira, principalmente as etapas de síntese de proteínas, síntese de material genético, montagem e liberação da partícula viral (SILVEIRA, 2016).

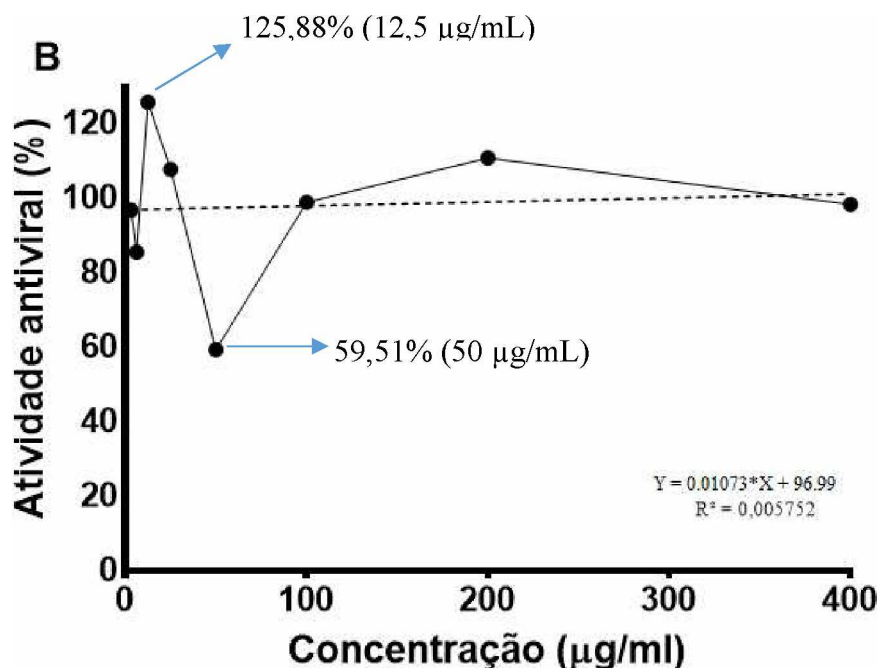
Na **Figura 4** são apresentados os resultados de atividade antiviral para o ensaio pré-tratamento. Os valores variaram entre 0,23%, para a concentração de 6,25 µg/mL, e 86,48% para a concentração de 25,0 µg/mL. Já no ensaio pós-tratamento (**Figura 5**), o valor máximo de atividade antiviral foi de 125,88% para a concentração de 12,5 µg/mL, e mínimo de 59,51% para a concentração de 50,0 µg/mL de peptídeo. Sendo assim, no presente estudo, os resultados obtidos indicam que o peptídeo analisado apresenta uma tendência à atividade antiviral contra a infecção pelo VRS, independente da dose utilizada. Já a diferença dos valores observados entre os ensaios pré e pós-tratamento sugere que o peptídeo atue com maior eficácia nas etapas posteriores à entrada do vírus na célula hospedeira.

Figura 4: Atividade antiviral (%) do peptídeo analisado obtida no ensaio pré-tratamento contra o VRS, cepa A2. A atividade antiviral foi calculada em porcentagem, por comparação dos resultados das densidades ópticas (A560) obtidas para as células tratadas com as diferentes concentrações dos peptídeos, em relação aos controles viral e celular. A linha tracejada do gráfico representa a tendência da atividade antiviral, demonstrando que não existe correlação entre a atividade antiviral (%) e as concentrações do peptídeo analisado ($p > 0,05$). O valor máximo e mínimo de atividade antiviral estão indicados pelas setas.



Fonte: Próprio autor.

Figura 5: Atividade antiviral (%) do peptídeo analisado obtida no ensaio pós-tratamento contra o VRS, cepa A2. A atividade antiviral foi calculada em porcentagem, por comparação dos resultados das densidades ópticas (A560) obtidas para as células tratadas com as diferentes concentrações dos peptídeos, em relação aos controles viral e celular. A linha tracejada do gráfico representa a tendência da atividade antiviral, demonstrando que não existe correlação entre a atividade antiviral (%) e as concentrações do peptídeo analisado ($p > 0,05$). O valor máximo e mínimo de atividade antiviral estão indicados pelas setas.



Fonte: Próprio autor.

Em um trabalho recente, Uddin e colaboradores (2016) analisaram o efeito inibitório do veneno de abelha (*Apis mellifera* L.), rico em peptídeos, contra vírus não-envelopados e envelopados. As análises de um ensaio virucida contra o VRS, também realizadas utilizando células HEP-2, indicaram que o composto utilizado a uma concentração de 2,0 µg/mL foi capaz de inibir a ação viral 7 vezes mais que o controle experimental. Entretanto, os autores realizaram seus experimentos com apenas 24h de infecção, tempo consideravelmente menor que o empregado para análise do peptídeo sintético aqui investigado, que foi de aproximadamente 72h. A realização desse tipo de ensaio permite analisar se o material teste consegue ou não agir diretamente contra a partícula viral, complementando as análises pré e pós-tratamento (MULLER, 2011), o que também poderá ser feito nas próximas etapas de estudo do peptídeo sintético aqui analisado.

Apesar dos estudos que avaliam os venenos brutos ou seus derivados diretamente contra o VRS existirem em menor quantidade, há trabalhos que descrevem a utilização de outros grupos de substâncias naturais ou sintéticas como forma de inibição da infecção por esse vírus (DETALLE et al., 2016; DOUGLAS et al., 2005; CIANCI; MEANWELL; KRYSTAL, 2005;

BUDGE et al., 2004; RAZINKOV et al., 2001; PASTEY et al., 2000). Em uma pesquisa de 2013, Yeh e colaboradores investigaram o efeito antiviral do extrato aquoso de *Cinnamomum cassia* Blume contra o VRS, cepa A2. Observou-se que o extrato foi capaz de inibir a formação de placas de lise virais de forma dose-dependente, com uma taxa de inibição de quase 100% quando presente a 30,0 µg/mL. Ainda, diferente dos resultados encontrados no presente trabalho, os dados do estudo indicaram que a aplicação do composto nas células HEp-2 antes da inoculação viral (pré-tratamento) foi mais efetiva em relação à quando o extrato foi adicionado 1h após a inoculação viral (pós-tratamento). Em outro trabalho, cujo objetivo foi realizar a triagem de compostos sintéticos com atividade antiviral in vitro, Lundin e colaboradores (2010) identificaram duas moléculas, P13 e C15, que foram capazes de inibir em 50% a formação de placas induzidas pelo VRS nas concentrações de 0,11 e 0,13 µM, respectivamente. Em semelhança ao obtido no presente trabalho, os dados reportados pelos autores sugerem que ambas as moléculas a 20 µM são mais efetivas quando adicionadas posteriormente à infecção viral (pós-tratamento), inibindo as etapas de replicação do vírus.

Trabalhos que utilizam moléculas derivadas do veneno de escorpião contra outros vírus também podem ser encontrados na literatura (ZENG et al., 2018; EL-BITAR et al., 2015; HONG et al., 2014; HONG et al., 2013; LI et al., 2011; CHEN et al., 2012; ZHAO et al., 2009; DAI et al., 2008) e reforçam a importância do estudo da peçonha desses animais, já que esta contém uma grande variedade de proteínas e peptídeos com atividades farmacológicas relevantes (ORTIZ et al., 2015; HARRISON et al., 2014).

Hong e colaboradores (2014) mostraram in vitro que os peptídeos Hp1036 e Hp1239, derivados do veneno de *Heterometrus petersii*, possuem atividade antiviral contra o vírus herpes simples tipo 1 (HSV-1). Devido as suas semelhanças estruturais, as moléculas apresentaram atividades bastante semelhantes, agindo de forma dose-dependente nas etapas de adsorção, penetração e também após a infecção, quando ambas apresentaram menor atividade inibitória contra o HSV-1. De forma semelhante, El-Bitar e colaboradores (2015) observaram que o veneno bruto de *Scorpio maurus palmatus* foi capaz de inibir a ação do vírus da hepatite C (HCV), sendo mais efetivo nas etapas de entrada do vírus na célula hospedeira. Isso demonstra a variação de resultados que podem ser encontrados de acordo com a molécula, composto e agente viral de estudo.

Apesar da grande quantidade de dados já disponíveis e moléculas testadas, até o momento não há vacina ou tratamento acessível e eficaz disponível contra o VRS. Este é o primeiro trabalho do nosso grupo de pesquisa sobre atividade antiviral contra o VRS. Sendo assim, os resultados aqui apresentados tornam-se relevantes, pois sugerem que o peptídeo

analisado apresenta atividade antiviral, e futuramente, poderá ser utilizado em ensaios in vivo contra a infecção causada pelo VRS. Tendo isso em vista, novos testes poderão ser realizados para a confirmação da atividade antiviral aqui demonstrada, garantindo maior acurácia nos resultados.

6 CONCLUSÕES

1 - Através da utilização da linhagem celular HEp-2 para o cultivo viral e uma técnica de coloração simples e de baixo custo, foi possível determinar o título do vírus respiratório sincicial (VRS), cepa A2, em $2,7 \times 10^7$ UFP/mL.

2 – Os resultados apresentados neste estudo sugerem que o peptídeo sintético analisado apresenta atividade antiviral in vitro contra o VRS, cepa A2, sendo a inibição viral mais efetiva nas etapas finais do ciclo de replicação do que nas etapas de adsorção e penetração.

REFERÊNCIAS

- BAER, A.; KEHN-HALL, K. Viral concentration determination through plaque assays: using traditional and novel overlay systems. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, n. 93, p. e52065, 4 nov. 2014.
- BARREIROS, A. L. B. S. **Peptídeos e proteínas**. Disponível em: <http://www.cesadufs.com.br/ORBI/public/uploadCatalogo/12214210072012Quimica_Biomoleculas_aula_4.pdf>. Acesso em: 28 set. 2018.
- BERG, J. M.; STRYER, L.; TYMOCZKO, J. L. **Bioquímica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.
- BLOOM-FESHBACH, K. et al. Latitudinal Variations in Seasonal Activity of Influenza and Respiratory Syncytial Virus (RSV): A Global Comparative Review. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, 14 fev. 2013.
- BROBERG, E. K. et al. Seasonality and geographical spread of respiratory syncytial virus epidemics in 15 European countries, 2010 to 2016. **Eurosurveillance**, v. 23, n. 5, 1 fev. 2018.
- BUDGE, P. J. et al. RhoA-Derived Peptide Dimers Share Mechanistic Properties with Other Polyanionic Inhibitors of Respiratory Syncytial Virus (RSV), Including Disruption of Viral Attachment and Dependence on RSV G. **Journal of Virology**, v. 78, n. 10, p. 5015–5022, maio 2004.
- CANDEIAS, J. A. Isolation of the respiratory syncytial virus from children with acute respiratory infections. **Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo**, v. 9, n. 1, p. 27–30, fev. 1967.
- CHANG, C.-H. et al. A novel class of anti-HIV agents with multiple copies of enfuvirtide enhances inhibition of viral replication and cellular transmission in vitro. **PloS One**, v. 7, n. 7, p. e41235, 2012.
- CHANG, K. Y.; YANG, J.-R. Analysis and Prediction of Highly Effective Antiviral Peptides Based on Random Forests. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, 5 ago. 2013.
- CHANOCK, R.; FINBERG, L. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). II. Epidemiologic aspects of infection in infants and young children. **American Journal of Hygiene**, v. 66, n. 3, p. 291–300, nov. 1957.

CHANOCK, R.; ROIZMAN, B.; MYERS, R. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation, properties and characterization. **American Journal of Hygiene**, v. 66, n. 3, p. 281–290, nov. 1957.

CHECCHIA, P. A. et al. Defining the Risk and Associated Morbidity and Mortality of Severe Respiratory Syncytial Virus Infection Among Infants with Congenital Heart Disease. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 6, n. 1, p. 37–56, mar. 2017.

CHEN, Y. et al. Anti-HIV-1 activity of a new scorpion venom peptide derivative Kn2-7. **PloS One**, v. 7, n. 4, p. e34947, 2012.

CHEW, M.-F.; POH, K.-S.; POH, C.-L. Peptides as Therapeutic Agents for Dengue Virus. **International Journal of Medical Sciences**, v. 14, n. 13, p. 1342–1359, 2017.

CIANCI, C.; MEANWELL, N.; KRYSTAL, M. Antiviral activity and molecular mechanism of an orally active respiratory syncytial virus fusion inhibitor. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, n. 3, p. 289–292, mar. 2005.

COLLINS, P. L.; FEARNES, R.; GRAHAM, B. S. Respiratory syncytial virus: virology, reverse genetics, and pathogenesis of disease. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 372, p. 3–38, 2013.

CONLON, J. M. et al. Potential therapeutic applications of multifunctional host-defense peptides from frog skin as anti-cancer, anti-viral, immunomodulatory, and anti-diabetic agents. **Peptides**, v. 57, p. 67–77, jul. 2014.

COOPER, G. M.; HAUSMAN, R. E. **The cell: a molecular approach**. 6th ed. Washington: ASM Press: Sinauer Associates, 2013.

CORRY, J. et al. Preventing Cleavage of the Respiratory Syncytial Virus Attachment Protein in Vero Cells Rescues the Infectivity of Progeny Virus for Primary Human Airway Cultures. **Journal of Virology**, v. 90, n. 3, p. 1311–1320, 01 2016.

CUI, G. et al. Rapid replacement of prevailing genotype of human respiratory syncytial virus by genotype ON1 in Beijing, 2012–2014. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 33, p. 163–168, jul. 2015.

DA MATA, É. C. G. et al. Antiviral activity of animal venom peptides and related compounds. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 23, p. 3, 2017.

DAI, C. et al. Mucroporin, the first cationic host defense peptide from the venom of *Lychas mucronatus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 11, p. 3967–3972, nov. 2008.

DE-PARIS, F. et al. Evaluation of respiratory syncytial virus group A and B genotypes among nosocomial and community-acquired pediatric infections in southern Brazil. **Virology Journal**, v. 11, p. 36, 24 fev. 2014.

DERSCHEID, R. J. et al. Human respiratory syncytial virus Memphis 37 grown in HEp-2 cells causes more severe disease in lambs than virus grown in Vero cells. **Viruses**, v. 5, n. 11, p. 2881–2897, 22 nov. 2013.

DETALLE, L. et al. Generation and Characterization of ALX-0171, a Potent Novel Therapeutic Nanobody for the Treatment of Respiratory Syncytial Virus Infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 1, p. 6–13, 1 jan. 2016.

DÍEZ-DOMINGO, J. et al. Social, economic, and health impact of the respiratory syncytial virus: a systematic search. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, 30 out. 2014.

DOUGLAS, J. L. et al. Small Molecules VP-14637 and JNJ-2408068 Inhibit Respiratory Syncytial Virus Fusion by Similar Mechanisms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2460–2466, jun. 2005.

DULBECCO, R.; VOGT, M. Some problems of animal virology as studied by the plaque technique. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 18, p. 273–279, 1953.

EL-BITAR, A. M. H. et al. Virocidal activity of Egyptian scorpion venoms against hepatitis C virus. **Virology Journal**, v. 12, p. 47, 24 mar. 2015.

ESPOSITO, S. et al. Characteristics and Their Clinical Relevance of Respiratory Syncytial Virus Types and Genotypes Circulating in Northern Italy in Five Consecutive Winter Seasons. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0129369, 5 jun. 2015.

FELTES, T. F. et al. Palivizumab prophylaxis reduces hospitalization due to respiratory syncytial virus in young children with hemodynamically significant congenital heart disease. **The Journal of Pediatrics**, v. 143, n. 4, p. 532–540, out. 2003.

FODHA, I. et al. Respiratory syncytial virus infections in hospitalized infants: Association between viral load, virus subgroup, and disease severity. **Journal of Medical Virology**, v. 79, n. 12, p. 1951–1958, dez. 2007.

FOSGERAU, K.; HOFFMANN, T. Peptide therapeutics: current status and future directions. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 1, p. 122–128, jan. 2015.

GAGLIARDI, T. B. et al. Syncytia Induction by Clinical Isolates of Human Respiratory Syncytial Virus A. **Intervirology**, v. 60, n. 1–2, p. 56–60, 2017.

GONZÁLEZ-PARRA, G.; DOBROVOLNY, H. M. A quantitative assessment of dynamical differences of RSV infections in vitro and in vivo. **Virology**, v. 523, p. 129–139, out. 2018.

GOWER, T. L. et al. RhoA Signaling Is Required for Respiratory Syncytial Virus-Induced Syncytium Formation and Filamentous Virion Morphology. **Journal of Virology**, v. 79, n. 9, p. 5326–5336, maio 2005.

GREEN, T. J. et al. Evidence that the major hemolymph protein of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, has antiviral activity against herpesviruses. **Antiviral Research**, v. 110, p. 168–174, out. 2014.

GREEN, T.; SPECK, P. Antiviral Defense and Innate Immune Memory in the Oyster. **Viruses**, v. 10, n. 3, p. 133, 16 mar. 2018.

GWYER FINDLAY, E.; CURRIE, S. M.; DAVIDSON, D. J. Cationic host defence peptides: potential as antiviral therapeutics. **BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy**, v. 27, n. 5, p. 479–493, out. 2013.

HABER, N. Respiratory syncytial virus infection in elderly adults. **Medecine Et Maladies Infectieuses**, v. 48, n. 6, p. 377–382, set. 2018.

HARRISON, P. L. et al. Antimicrobial peptides from scorpion venoms. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 88, p. 115–137, set. 2014.

HE, Y. et al. Potent HIV fusion inhibitors against Enfuvirtide-resistant HIV-1 strains. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 42, p. 16332–16337, 21 out. 2008.

HEIKKINEN, T.; OJALA, E.; WARIS, M. Clinical and Socioeconomic Burden of Respiratory Syncytial Virus Infection in Children. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 215, n. 1, p. 17–23, 1 jan. 2017.

HEMINWAY, B. R. et al. Analysis of respiratory syncytial virus F, G, and SH proteins in cell fusion. **Virology**, v. 200, n. 2, p. 801–805, 1 maio 1994.

HONG, W. et al. Design of histidine-rich peptides with enhanced bioavailability and inhibitory activity against hepatitis C virus. **Biomaterials**, v. 34, n. 13, p. 3511–3522, 1 abr. 2013.

HONG, W. et al. Inhibitory activity and mechanism of two scorpion venom peptides against herpes simplex virus type 1. **Antiviral Research**, v. 102, p. 1–10, fev. 2014.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>>. Acesso em: 27 set. 2018.

JEPSEN, M. T. et al. Incidence and seasonality of respiratory syncytial virus hospitalisations in young children in Denmark, 2010 to 2015. **Eurosurveillance**, v. 23, n. 3, 18 jan. 2018.

SOUZA, F. B. J. **Cultivo e titulação do vírus respiratório sincicial (VRS), cepa A2, em linhagem de células tumorais de carcinoma de laringe humana (hep-2)**. 2018. 31 f. TCC (Graduação) - Curso de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, 2018.

JORDAN, W. S. Growth characteristics of respiratory syncytial virus. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 88, p. 581–590, maio 1962.

KANGRO, H. O. **Virology Methods Manual**. Burlington: Elsevier, 1996.

KASPAR, A. A.; REICHERT, J. M. Future directions for peptide therapeutics development. **Drug Discovery Today**, v. 18, n. 17–18, p. 807–817, set. 2013.

KUA, K. P.; LEE, S. W. H. Systematic Review of the Safety and Efficacy of Palivizumab among Infants and Young Children with Cystic Fibrosis. **Pharmacotherapy**, v. 37, n. 6, p. 755–769, jun. 2017.

KWILAS, S. et al. Respiratory Syncytial Virus Grown in Vero Cells Contains a Truncated Attachment Protein That Alters Its Infectivity and Dependence on Glycosaminoglycans. **Journal of Virology**, v. 83, n. 20, p. 10710–10718, 15 out. 2009.

LAHAM, F. R. et al. Clinical Profiles of Respiratory Syncytial Virus Subtypes A AND B Among Children Hospitalized with Bronchiolitis. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 36, n. 8, p. 808–810, ago. 2017.

LI, Q. et al. Virucidal activity of a scorpion venom peptide variant mucroporin-M1 against measles, SARS-CoV and influenza H5N1 viruses. **Peptides**, v. 32, n. 7, p. 1518–1525, jul. 2011.

LÓPEZ-MARTÍNEZ, R. et al. Inhibition of Influenza A Virus Infection In Vitro by Peptides Designed In Silico. **PLOS ONE**, v. 8, n. 10, p. e76876, 11 out. 2013.

LUNDIN, A. et al. Two novel fusion inhibitors of human respiratory syncytial virus. **Antiviral Research**, v. 88, n. 3, p. 317–324, dez. 2010.

MACHADO, D. B. B. **Identificação e caracterização molecular do vírus sincicial respiratório humano em crianças com infecções respiratórias de 2006 a 2010**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2012.

MAKINSON, A.; REYNES, J. The fusion inhibitor enfuvirtide in recent antiretroviral strategies. **Current opinion in HIV and AIDS**, v. 4, n. 2, p. 150–158, mar. 2009.

MANZONI, P. et al. Outcomes of Infants Receiving Palivizumab Prophylaxis for Respiratory Syncytial Virus in Canada and Italy: An International, Prospective Cohort Study. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 36, n. 1, p. 2–8, 2017.

MÁRQUEZ-ESCOBAR, V. A. et al. HRA2pl peptide: a fusion inhibitor for human metapneumovirus produced in tobacco plants by transient transformation. **Planta**, v. 242, n. 1, p. 69–76, jul. 2015.

MARTINELLO, R. A. et al. Correlation between Respiratory Syncytial Virus Genotype and Severity of Illness. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 6, p. 839–842, 15 set. 2002.

MATTHEWS, T. et al. Enfuvirtide: the first therapy to inhibit the entry of HIV-1 into host CD4 lymphocytes. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 3, n. 3, p. 215–225, mar. 2004.

MENG, J. et al. An Overview of Respiratory Syncytial Virus. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 4, 24 abr. 2014.

MORRIS, J. A.; BLOUNT, R. E.; SAVAGE, R. E. Recovery of Cytopathogenic Agent from Chimpanzees with Goryza. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 92, n. 3, p. 544–549, 1 jul. 1956.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 16 dez. 1983.

MOURA, F. E. A. et al. Respiratory syncytial virus epidemic periods in an equatorial city of Brazil. **Influenza and Other Respiratory Viruses**, v. 7, n. 6, p. 1128–1135, nov. 2013.

MUFSON, M. A. et al. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. **The Journal of General Virology**, v. 66 (Pt 10), p. 2111–2124, out. 1985.

MULLER, V. D. M. **Avaliação da atividade antiviral de peçonhas de serpentes e escorpião contra os vírus da dengue e da febre amarela**. 2011. 102 p. Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2011.

MURRAY, J.; SAXENA, S.; SHARLAND, M. Preventing severe respiratory syncytial virus disease: passive, active immunisation and new antivirals. **Archives of Disease in Childhood**, v. 99, n. 5, p. 469–473, maio 2014.

MUSIDLAK, O.; NAWROT, R.; GOŹDZICKA-JÓZEPIAK, A. Which Plant Proteins Are Involved in Antiviral Defense? Review on In Vivo and In Vitro Activities of Selected Plant Proteins against Viruses. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 11, p. 2300, 1 nov. 2017.

NELSON, D. L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2011. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

OBANDO-PACHECO, P. et al. Respiratory Syncytial Virus Seasonality: A Global Overview. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 217, n. 9, p. 1356–1364, 11 abr. 2018.

ORTIZ, E. et al. Scorpion venom components as potential candidates for drug development. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 93, p. 125–135, jan. 2015.

OTIENO, J. R. et al. Spread and Evolution of Respiratory Syncytial Virus A Genotype ON1, Coastal Kenya, 2010–2015. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 2, p. 264–271, fev. 2017.

PAIVA, T. M. et al. Shift in the timing of respiratory syncytial virus circulation in a subtropical megalopolis: implications for immunoprophylaxis. **Journal of Medical Virology**, v. 84, n. 11, p. 1825–1830, nov. 2012.

Palivizumab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduces hospitalization from respiratory syncytial virus infection in high-risk infants. The IMPact-RSV Study Group. **Pediatrics**, v. 102, n. 3 Pt 1, p. 531–537, set. 1998.

PANG, W.; TAM, S.-C.; ZHENG, Y.-T. Current peptide HIV type-1 fusion inhibitors. **Antiviral Chemistry & Chemotherapy**, v. 20, n. 1, p. 1–18, 25 set. 2009.

PANGESTI, K. N. A. et al. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. **Reviews in Medical Virology**, v. 28, n. 2, mar. 2018.

PASTEY, M. K. et al. A RhoA-derived peptide inhibits syncytium formation induced by respiratory syncytial virus and parainfluenza virus type 3. **Nature Medicine**, v. 6, n. 1, p. 35–40, jan. 2000.

PAVILACK, M. et al. Trends in Utilization of Outpatient Respiratory Syncytial Virus Prophylaxis with Palivizumab among Medicaid- and Commercially Insured Infants. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 7, n. 1, p. 121–134, mar. 2018.

PAYNTER, S. Humidity and respiratory virus transmission in tropical and temperate settings. **Epidemiology and Infection**, v. 143, n. 6, p. 1110–1118, abr. 2015.

PENNINGTON, M. W.; CZERWINSKI, A.; NORTON, R. S. Peptide therapeutics from venom: Current status and potential. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 10, p. 2738–2758, jun. 2018.

PICA, N.; BOUVIER, N. M. Ambient temperature and respiratory virus infection. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 33, n. 3, p. 311–313, mar. 2014.

Prevention of respiratory syncytial virus infections: indications for the use of palivizumab and update on the use of RSV-IGIV. American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases and Committee of Fetus and Newborn. **Pediatrics**, v. 102, n. 5, p. 1211–1216, nov. 1998.

QURESHI, A. et al. AVPdb: a database of experimentally validated antiviral peptides targeting medically important viruses. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. Database issue, p. D1147–1153, jan. 2014.

RAAYMAKERS, C. et al. Antimicrobial peptides in frog poisons constitute a molecular toxin delivery system against predators. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1495, 14 2017.

RAZINKOV, V. et al. RFI-641 inhibits entry of respiratory syncytial virus via interactions with fusion protein. **Chemistry & Biology**, v. 8, n. 7, p. 645–659, jul. 2001.

SHAIKH, F. Y.; CROWE, J. E. Molecular mechanisms driving respiratory syncytial virus assembly. **Future microbiology**, v. 8, p. 123–131, jan. 2013.

SHAN, Y. et al. Purification and characterization of a novel anti-HSV-2 protein with antiproliferative and peroxidase activities from *Stellaria media*. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 45, n. 8, p. 649–655, ago. 2013.

SHI, T. et al. Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. **Lancet (London, England)**, v. 390, n. 10098, p. 946–958, 2 set. 2017.

SHIGETA, S. et al. The Cell to Cell Infection of Respiratory Syncytial Virus in HEp-2 Monolayer Cultures. **Journal of General Virology**, v. 3, n. 1, p. 129–131, 1 jul. 1968.

SILVEIRA, P. F. **Análise da atividade antiviral de compostos derivados de naftoquinonas naturais e sintéticas sobre a replicação de dengue vírus em modelo in vitro**. 2016. 66 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Ouro Preto, 2016.

SIMÕES, E. A. F. et al. Past, Present and Future Approaches to the Prevention and Treatment of Respiratory Syncytial Virus Infection in Children. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 7, n. 1, p. 87–120, mar. 2018.

SKALICKOVA, S. et al. Perspective of Use of Antiviral Peptides against Influenza Virus. **Viruses**, v. 7, n. 10, p. 5428–5442, 20 out. 2015.

STEIN, R. T. et al. Respiratory syncytial virus hospitalization and mortality: Systematic review and meta-analysis. **Pediatric Pulmonology**, v. 52, n. 4, p. 556–569, 2017.

TAYLOR, G. Animal models of respiratory syncytial virus infection. **Vaccine**, v. 35, n. 3, p. 469–480, 11 2017.

TAYLOR, S. et al. Modelling estimates of the burden of respiratory syncytial virus infection in children in the UK. **BMJ open**, v. 6, n. 6, p. e009337, 02 2016.

THAKUR, N.; QURESHI, A.; KUMAR, M. AVPpred: collection and prediction of highly effective antiviral peptides. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. Web Server issue, p. W199–W204, jul. 2012.

TIWARI, P. M. et al. Atomic force microscopic investigation of respiratory syncytial virus infection in HEp-2 cells. **Journal of Microscopy**, v. 253, n. 1, p. 31–41, jan. 2014.

TRIPP, R. A.; JORQUERA, P. A. (EDS.). **Human Respiratory Syncytial Virus: Methods and Protocols**. [s.l.] Humana Press, 2016.

UDDIN, M. B. et al. Inhibitory effects of bee venom and its components against viruses in vitro and in vivo. **Journal of Microbiology (Seoul, Korea)**, v. 54, n. 12, p. 853–866, dez. 2016.

UHLIG, T. et al. The emergence of peptides in the pharmaceutical business: From exploration to exploitation. **EuPA Open Proteomics**, v. 4, p. 58–69, set. 2014.

VANDINI, S.; BIAGI, C.; LANARI, M. Respiratory Syncytial Virus: The Influence of Serotype and Genotype Variability on Clinical Course of Infection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 8, 6 ago. 2017.

VILLAFANA, T. et al. Passive and active immunization against respiratory syncytial virus for the young and old. **Expert Review of Vaccines**, v. 16, n. 7, p. 1–13, 2017.

WANG, X.; WANG, G. Insights into Antimicrobial Peptides from Spiders and Scorpions. **Protein and Peptide Letters**, v. 23, n. 8, p. 707–721, 2016.

WIESNER, J.; VILCINSKAS, A. Antimicrobial peptides: The ancient arm of the human immune system. **Virulence**, v. 1, n. 5, p. 440–464, set. 2010.

XU, X. et al. A-Type Proanthocyanidins from Lychee Seeds and Their Antioxidant and Antiviral Activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 22, p. 11667–11672, 24 nov. 2010.

YEH, C. F. et al. Water extract of *Cinnamomum cassia* Blume inhibited human respiratory syncytial virus by preventing viral attachment, internalization, and syncytium formation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, n. 2, p. 321–326, 20 maio 2013.

YOSHIHARA, K. et al. Association of RSV-A ON1 genotype with Increased Pediatric Acute Lower Respiratory Tract Infection in Vietnam. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, set. 2016.

ZENG, Z. et al. Histidine-rich Modification of a Scorpion-derived Peptide Improves Bioavailability and Inhibitory Activity against HSV-1. **Theranostics**, v. 8, n. 1, p. 199–211, 2018.

ZHAO, Z. et al. Imcroporin, a new cationic antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Isometrus maculatus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 8, p. 3472–3477, ago. 2009.